

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Klein

Quantitative Bestimmung des C1-Esterase-Inhibitors
- Vergleich zweier direkter Meßmethoden -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Lothar Bohn
aus Köln

Mainz 1973

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. P. Klein

Quantitative Bestimmung des Cl-Esterase-Inhibitors

- Vergleich zweier direkter Meßmethoden -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Lothar Bohn

aus Köln

Mainz 1973



Fachbereichsdekan : Professor Dr. P. Klein
Referent : Professor Dr. W. Opferkuch
Korreferent : Professor Dr. Dr. O. Herfert
Tag der mündlichen Prüfung : 26.6.1974

CHRISTOPHER JENNIE

WEDNESDAY

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY

WEDNESDAY

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY, 12th FEBRUARY 1903

WEDNESDAY

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1. Reaktionsmechanismen der C1-Esterase und ihres Inhibitors im Komplementsystem.	1
1.2. Beziehung des C1-Esterase-Inhibitors zum Krankheitsbild des hereditären angioneurotischen Ödems.	3
1.3. Ziel der Arbeit.	5
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	7
2.1. Material.	7
2.2. Versuchsaufbau und -durchführung.	10
2.3. Statistische Verfahren.	16
3. <u>ERGEBNISSE</u>	17
4. <u>DISKUSSION</u>	26
4.1. Zusammenstellung der Versuchsergebnisse.	26
4.2. Vergleich der beiden Testmethoden.	28
4.3. Pathophysiologische Mechanismen im Komplementsystem im Zusammenhang mit dem hereditären angioneurotischen Ödem.	29
4.4. Therapiemöglichkeiten.	31
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	33
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	34

1. EINLEITUNG

1.1. Reaktionsmechanismen der C1-Esterase und ihres Inhibitors im Komplementsystem.

Zu den Abwehrmechanismen des Blutes zählt das Komplementsystem, dessen biologische Funktion in jüngster Zeit intensiv erforscht wurde. Dabei zeigte sich, daß Komplement eine bedeutende Rolle bei immun-pathologischen Reaktionen in menschlichen Organismen spielt. Der Begriff Komplement umschreibt z. Zt. 11 Proteine, von denen einige als Enzyme, andere als Substrate dieser Enzyme fungieren. Die einzelnen Komponenten werden mit den Symbolen C 1 - C 9 bezeichnet, wobei die Untereinheiten C1q, C1r und C1s der ersten Komplementkomponente getrennt gezählt werden¹⁾. Sie reagieren in einer ganz bestimmten Sequenz mit Antigen-Antikörper-Komplexen (AgAk). Am Modell des sensibilisierten Erythrozyten (EA) läßt sich die Reaktion wie folgt darstellen: EA-C1-C4-C2-C3-C5-C6-C7-C8-C9. Dabei können die einzelnen Intermediärprodukte $EAC\bar{1}$, $EAC\bar{1}\bar{4}$, $EAC\bar{1}\bar{4}\bar{2}$, $EAC\bar{1}\bar{4}\bar{2}\bar{3}$ ²⁾ u.s.w. in vitro schrittweise nachvollzogen und isoliert werden.

Die erste Komplementkomponente (C1) ist ein Makromolekül mit einer Sedimentationskonstanten von 19 S und einem MG $\approx$ 1.000.000. Die bisher bekannten funktionellen Untereinheiten C1q, C1r und C1s werden offensichtlich durch Kalziumionen zusammengehalten (Lepow et al. 1963; Naff et al. 1964).

1) Nomenklatur entsprechend dem Vorschlag der WHO: "Nomenclature of Complement", Bull. WHO 39, 935 (1968)

2) Der Querstrich über den Zahlen zeigt die aktive Form der Komplementkomponente an.

Die Bindung von C1 an AgAk erfolgt durch den C1q Anteil, der eine spezifische "binding site" zu dem Fc-Anteil des Antikörpers besitzt. Die Anlagerung von C1 an AgAk-Komplexe führt zur Aktivierung der C1s Unterkomponente. Die aktivierte Komponente $C1\bar{s}$, die sogenannte C1-Esterase, besitzt im Gegensatz zu deren Vorstufe, der C1-Proesterase (C1s) enzymatische Eigenschaften gegenüber den beiden in der Sequenz folgenden Komponenten C 4 und C 2. Die Aktivierung von C1s zu $C1\bar{s}$ ist zeit- und temperaturabhängig. Über die Vorgänge, die sich nach der Bindung von C1q und vor dem Auftreten der $C1\bar{s}$ Aktivität abspielen, ist nichts bekannt. Es konnte lediglich an der isolierten Proesterase gezeigt werden, daß diese durch C1r zu $C1\bar{s}$ aktiviert werden kann (Naff, Ratnoff 1968).

Ein im Serum natürlich vorkommender Inhibitor (C1-Esterase-Inhibitor) hemmt die Wirkung der C1-Esterase gegenüber C 4 und C 2. Dieser Inhibitor wurde erstmals von Levy und Lepow (1959) als ein hitzelabiler, nicht dialysierbarer Eiweißkörper beschrieben, der die esterolytische Aktivität von $C1\bar{s}$ hemmt. Pensky et al. (1961) reinigte als erster den C1-Esterase-Inhibitor und wies nach, daß der Inhibitor sich von Plasmin und Trypsin chemisch unterscheidet. Der Inhibitor ist ein α -2-Globulin mit einer Sedimentationskonstanten von 4,5 S und einem $\approx$ MC 90.000 (Pensky et al. 1961). Er zerfällt bei Temperaturen über 48°C und bei pH-Werten unter 5,5 (Ruddy, Austen 1972).

Chemisch setzt sich das Protein aus 25 % Kohlenhydrat, 12 % Hexosen und 17 % Neuraminsäure zusammen. Dieser Inhibitor ist identisch mit einem α -2-neuraminoglucopein, welches von Schultze et al. (1962) als inaktives Protein isoliert wurde (Pensky, Schwick 1969).

Der C1-Esterase-Inhibitor reagiert nur mit der aktivierten Untereinheit $C1\bar{s}$; er hat dagegen keine Hemmwirkung gegenüber der C1-Proesterase, der Form, in der diese Unterkomponente normalerweise im Serum vorhanden ist (Lepow et al. 1958). Der C1-Esterase-Inhibitor wirkt sowohl auf freies als auch auf gebundenes CT ($EAC\bar{1}$, $EAC\bar{1}4$).

Die Reaktion des Inhibitors mit $C\bar{I}$ ist zeit- und temperaturabhängig (Loos et al. 1972). Sowohl künstliche Substrate der C1-Esterase (z.B. TAME¹⁾; ATEe²⁾) als auch die beiden natürlichen Substrate C 4 und C 2 vermindern die Hemmung von $C\bar{I}$ durch den Inaktivator. Der Inhibitor reagiert stöchiometrisch mit $C\bar{I}$, wobei jedoch das Verhältnis vom Inaktivator zur C1-Esterase noch nicht geklärt ist. Die Inaktivierung von $C\bar{I}$ durch den Inaktivator ist nach den bisherigen Befunden als irreversibel zu bezeichnen.

1.2. Beziehung des C1-Esterase-Inhibitors zum Krankheitsbild des hereditären angioneurotischen Ödems.

Von Quincke wurde 1882 erstmals das Krankheitsbild des "akuten, circumscribten Hautödems" beschrieben. 1888 wies Osler darauf hin, daß diese Krankheit autosomal dominant vererbt wird, wobei nur die heterozygoten Individuen erkranken, da Homozygotie wahrscheinlich ein Letalfaktor ist.

Dies wurde bisher mehrmals mit genauen Familienanamnesen und Stammbäumen bestätigt. Landermann et al. (1962) verbindet dieses Hautödem mit einem Mangel an einem Inhibitor gegen das gefäßpermeabilitätssteigernde Kallikrein. Donaldson und Evans (1963) konnten jedoch zeigen, daß der Mangel an Inhibitor einem Defekt in der Biosynthese des C1-Esterase-Inhibitors zuzuschreiben ist und daß dieser im Zusammenhang mit dem nach Quincke bezeichneten "hereditären angioneurotischen Ödem" (HANE) steht.

In jüngster Zeit wird zwischen einem Quincke Ödem, welches eine Sonderform der Urticaria darstellt und dem hereditären angioneurotischen Ödem ('HANE), einer Variante des Quincke Ödems, unterschieden (Wüthrich 1970). Bei dem ersteren ist man sich über die Ätiologie in keiner Weise im klaren: Nahrungsmittel- und Medikamenten-

1) TAME = Paratoluolargininmethylester

2) ATEe = Acetyltyrosinäthylester

unverträglichkeit werden hauptsächlich als Ursache genannt.

Dagegen ist die Ätiologie bei dem hereditären angioneurotischen Ödem genau bekannt (Wüthrich 1970): Hier liegt stets eine Abnormalität des C1-Esterase-Inhibitors vor. Diese kann in drei verschiedenen Möglichkeiten zur Wirkung kommen:

1. Der C1-Esterase-Inhibitor liegt in verminderter Konzentration vor, d.h. die Produktion des Inhibitors durch den Organismus ist gestört (Austen, Sheffer 1965; Johnson et al. 1971).
2. Der Organismus bildet genügend Inhibitor, aber dieser liegt teilweise in inaktiver Form vor (Rosen et al. 1965; Laurell, Martensson 1971).
3. Als Protein kann der Inhibitor in 3 - 4 mal höherer Konzentration als normal im Serum vorkommen, wobei er jedoch funktionell inaktiv ist (Rosen et al. 1971).

Bei der unter 1. angeführten Pathogenese, der der weitaus größte Teil der an HANE erkrankten Patienten zuzuordnen ist, bestätigen Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenz, daß bei diesen Patienten die Synthese des C1-Esterase-Inhibitors in den Leberparenchymzellen gestört ist (Johnson et al. 1971). Der unter 2. und 3. angeführte Mangel an funktionell aktivem C1-Esterase-Inhibitor ist auf eine inaktive Form des Inhibitors zurückzuführen; diese inaktive Form weist eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in der Immunelektrophorese gegenüber der aktiven Form auf. Die inaktive Form bindet sich zuvor an $C\bar{1}$, wobei aber eine variierende Bindungskapazität gegenüber der C1-Esterase festgestellt werden konnte (Laurell et al. 1969; Rosen et al. 1971).

Das Krankheitsbild, das am häufigsten bei Jugendlichen auftritt, ist charakterisiert durch die rezidivierenden, circumscripiten, nicht juckenden, subepithelialen Ödeme der Haut, der Mucosa der Darm-

schleimhaut und der Schleimhaut der oberen Luftwege (Donaldson, Rosen 1966). Letzteres führt zu dem lebensbedrohlichen Larynxödem, an dem ca. 25 % der an HANE erkrankten Patienten sterben (Lander-
mann 1962).

Die Entstehungsursache solcher Ödeme ist völlig ungeklärt. Streß-
situationen, Traumen wie Zahnextraktionen oder Tonsillektomien
und Allergien werden in der Literatur als Initial für ein hereditäres
angioneurotisches Ödem angegeben.

3. Ziel der Arbeit.

Auf Grund der Erkenntnis, daß der C1-Esterase-Inhibitor eine
wichtige Rolle bei der Beurteilung des HANE spielt, gibt es eine
Reihe von biochemischen Untersuchungen. Für die Labordiagnostik
stehen 3 direkte Meßmethoden, welche quantitativ den C1-Esterase-
Inhibitor erfassen und mehrere indirekte Verfahren, die die Verminderung
der natürlichen Substrate der C1-Esterase C 4 und C 2 messen (s.oben),
zur Verfügung. Zu den direkten Meßmethoden zählen:

1. eine biochemische Methode (Titrationsmethode), Levy, Lepow (1959)
2. eine proteinchemische Methode (Mancinitechnik), Mancini et al.
(1965)
3. die Immunhämolysse, Gigli et al. (1968); Loos et al. (1972).

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Angaben über die Durch-
schnittswerte des C1-Esterase-Inhibitors bei Normalpersonen gemacht.
Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, eigene Untersuchungen über die
Normalserenverteilung anzustellen, die dann Rückschlüsse auf pathologi-
sche Seren zulassen. Im folgenden sollen die oben unter 1. und 2. ange-
führten direkten Meßmethoden des C1-Esterase-Inhibitors miteinander
verglichen werden. Dabei soll geklärt werden,

1. welche Normalwerte bei unseren Laboruntersuchungen als Grund-
lage gelten,

2. ob eine Korrelation zwischen den Versuchsergebnissen der proteinchemischen und der biochemischen Methode besteht und
3. ob man nicht beide Meßmethoden routinemäßig durchführen muß, um den Verdacht eines hereditären angioneurotischen Ödems bei einem Patientenserum verifizieren oder ausschließen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. G e r ä t e :

- 2.1.1.1. Combitrator 3 - D Fa. Metrohm
2. Mikropipetten, Fa. Eppendorf
3. Partigen^R Immundiffusionsplatten, Behring-Werke A.G.

2.1.2. P u f f e r :

2.1.2.1. Natriumacetat - Puffer, pH 5,5

- Stammlösung A: 0,2 m Essigsäure (CH_3COOH)
12g Essigsäure 99 % - 100 % ad 1000 ml
- Stammlösung B: 0,2 m Na-acetat p.A. Merck Nr. 6267
16,4g Na-acetat od. 27,2g Na -acetat x 3 H_2O

Stammlösungen werden bei 4°C aufbewahrt. Lösung A und Lösung B so mischen, daß sich ein pH-Wert von 5,5 einstellt, anschließend mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnen zur Herstellung einer 0,02 m Lösung.

2. Natriumchloridlösung, 0,3 m

Stammlösung: 3m NaCl-Lösung
NaCl 175,32g ad 1000 ml Aqua dest.

3. Natriumphosphatpuffer, 0,02 m pH 7,4

Leitfähigkeit K = 15

- Lösung A: 0,2 m Mononatriumphosphat (NaH_2PO_4)
27,5g NaH_2PO_4 ad 1000 ml
- Lösung B: 0,2 m Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)
35,6g Na_2HPO_4 ad 1000 ml

Lösung A und Lösung B so mischen, daß sich ein pH-Wert von 7,4 einstellt.

(Verhältnis Lsg A : Lsg B $\approx$ 20 : 80)

2.1.2.4. VBS - Puffer (Veronal buffered saline) nach Mayer
pH 7,3 , Ionenstärke 0,15

- Stammpuffer, VBS-konz. (pH 7,3 K = 14,5 - 15)

NaCl (Fa. Merck Nr. 6404) 88,3 g

Na-5,5-diäthyl-barbiturat 10,19 g

(Fa. Merck Nr. 6318)

1n HCl 34,58 ml

Aqua dem. ad 2000,00 ml

- Gebrauchspuffer, VBS (pH 7,3 K = 15)

VBS-konz. 20,0 ml

2,0m $MgCl_2$ 0,05 ml

0,3m $CaCl_2$ 0,05 ml

Aqua dem. ad 100,00 ml

Endkonzentrationen: Ca^{++} = 0,00015 m
 Mg^{++} = 0,001 m
 Na^+ = 0,15 m

2.1.3. Blutproben:

2.1.3.1. Frischblut (Vollblut) aus der Blutbank

2. Blutspenden von sog. Normalpersonen
3. Blutspenden von Patienten
4. Standard - Human - Serum Op. Nr. 570 (Behring-Werke A.G.)

Sämtliche Blutproben werden ohne Stabilisatoren erhalten und nach 2-stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur in der Kühlzentrifuge bei 0°C und 3000 U/min. 10 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt und erneut 5 min. lang zentrifugiert, in 0,5 ml Aliquots abgefüllt und bei -70°C eingefroren.

2.1.4. Sonstige Reagenzien:

- 2.1.4.1. N-Acetyl-L-tyrosin-äthylester (Fa. Serva Nr. 10 607) wird 1,6 m in Äthylenglycomonomethyläther (Fa. Serva Nr. 11 310) durch starkes Erwärmen gelöst.
2. Natriumhydroxyd $1/100$ n (Titrisollösung).

2.1.5. Präparation der C1-Esterase nach Lepow et al. (1958)

Aus dem Spenderserum wird bei 0°C durch Zugabe von Natrium-acetat-Puffer, pH 5,5 im Volumenverhältnis 1 : 8 eine Euglobulinfraction ausgefällt, die sich nach 15 Minuten langem Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge bei 16 000 U/min. am Rand der Zentrifugenröhrchen absetzt. Das Präzipitat löst sich in 0,3 m NaCl und wird hierin im Verhältnis 10 : 1 der eingesetzten Serummenge aufgenommen. Dieses Konzentrat wird 48 Stunden lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ in 4 Litern Na-phosphat-puffer pH 7,4 dialysiert, wobei die 4 l Puffer nach 24 Stunden einmal gewechselt werden. Die gereinigte C1-Proesterase wird nun im Wasserbad bei 37°C in ca. 30 min. in die aktive C1-Esterase umgewandelt und anschließend in Mengen von 550 μl bei -70°C eingefroren.

2.2. Versuchsaufbau und -durchführung

2.2.1. Titrationsmethode zur Bestimmung der C1-Esterase-Inhibitor Aktivität:

Um die C1-Esterase-Inhibitor Aktivität zu messen, wurde folgendes von Levy und Lepow (1959) angegebene Verfahren gewählt: Das Enzym C1-Esterase spaltet von seinem Substrat N-acetyl-L-tyrosin-äthylester (ATEe) Essigsäure ab. Diese Reaktion ist temperatur- und pH Wert-abhängig und läuft linear ab in bezug auf die Zeit, solange genügend Substrat vorhanden ist. Die zur Neutralisation der Säure benötigte NaOH-Menge kann quantitativ erfaßt werden und deshalb als Maß für die C1-Esterase Aktivität herangezogen werden.

Definition der C1-Esterase Einheit:

Nach Levy und Lepow (1959) wird die C1-Esterase Aktivität so bestimmt, daß 1 Einheit diejenige Enzymmenge darstellt, die bei 37°C und pH 7,4 in 15 min. so viel Säure aus dem Substrat ATEe abspaltet, daß 0,05 ml einer 0,01 n NaOH zur Neutralisation benötigt werden.

Da im Serum von gesunden Personen ein C1-Esterase-Inhibitor immer vorhanden ist, der die C1-Esterase in ihren Funktionen hemmt, kann man bei Zugabe eines Testserums zu einer standardisierten C1-Esterase Menge indirekt durch die Abnahme der Esterase Aktivität auf die Aktivität des Inhibitors schließen.

Definition der C1-Esterase-Inhibitor Einheit:

Levy und Lepow (1959) definieren die C1-Esterase-Inhibitor Aktivität wie folgt: " 1 E des C1-Esterase-Inhibitors ist diejenige Enzymmenge, die 10 E der C1-Esterase Aktivität in einer enzymatischen Reaktion aufhebt".

Da es in diesem Versuch nach dem Vorhergesagten darauf ankommen muß,

- 1) ein abgeschlossenes System zu erhalten (CO_2),
- 2) während der Versuchsdauer pH-Wert und Temperatur konstant zu halten und
- 3) die bei der Titration verbrauchte Flüssigkeitsmenge pro Zeiteinheit genau messen zu können,

benutzen wir den Combitorator (Fa. Metrohm) 3 - D als pH - Stat. Wir verwenden das Gerät, um die während der oben beschriebenen Enzymreaktion entstehende Essigsäure mit Hilfe der 1/100 n NaOH automatisch so zu titrieren, daß ein pH-Wert von 7,4 konstant gehalten wird. Hierbei wird das zur Konstanthaltung des pH-Wertes erforderliche NaOH-Volumen gegen die Zeit registriert. Die Reaktion findet bei 37°C in einem Stickstoffmilieu statt, das eine Verbindung des NaOH mit dem Luft- CO_2 verhindern soll.

Im einzelnen wird wie folgt vorgegangen: C1-Esterase und Testserum werden aufgetaut und während der Versuchsdauer im Eisbad aufbewahrt. Das Reaktionsgefäß wird in folgender Reihenfolge mit den Reagenzien beschickt:

1. 50 μl C1-Esterase
2. 1000 μl Natriumphosphatpuffer, der zum schnelleren Erreichen der gewünschten Temperatur vorher auf 37°C erwärmt wird.
3. 10 μl Testserum
4. 50 μl N-acetyl-L-tyrosin-äthylester (im oben genannten Verfahren hergestellt).

Wird nun linear zur Zeit fortwährend Essigsäure von ATee abgespalten, und somit der pH-Wert zu niedrigen Werten hin verändert, so kann durch gleichmäßige NaOH-Zufuhr die entstehende Säure neutralisiert werden.

Das Versuchsende ist meist nach ca. 10 - 15 min. erreicht, wenn der gerade Verlauf der Meßkurve deutlich erkennbar abflacht. Das Abflachen der Geraden entsteht entweder durch den Substratverbrauch oder durch den Spontanzerfall des künstlichen Esters.

Bei den Aktivitätsbestimmungen des C1-Esterase-Inhibitors muß besonders berücksichtigt werden, daß die Ergebnisse durch oftmaliges Einfrieren und Auftauen des Testserums und durch langes Aufbewahren bei Zimmertemperatur empfindlich beeinträchtigt werden. Nähere Untersuchungen über das Verhalten der C1-Esterase-Inhibitor Aktivität haben gezeigt, daß z.B. bei 2 Seren, die 8 mal aufgetaut und wieder eingefroren wurden, die Aktivität erheblich nachläßt, was folgende Versuchsreihe verdeutlicht:

	I. Serum E/ ml	II. Serum E/ ml
frisch	44,0	42,6
1 x aufgetaut	42,3	29,0
2 x "	39,6	17,6
3 x "	33,4	12,4
4 x "	25,2	17,4
5 x "	11,0	22,8
6 x "	10,8	18,2
7 x "	15,3	9,6
8 x "	0	5,3

Bei einem Serum, das über 6 Stunden in einem Wasserbad von 30°C aufbewahrt und bei dem alle halbe Stunde die Aktivität gemessen wurde, stellte sich ebenfalls ein erheblicher Aktivitätsverlust ein.

h	0	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2
E/ml	40,3	36,2	25,4	22,6	23,8	24,6	23,4	22,4

h	4	4 1/2	5	5 1/2	6
E/ml	20,8	18,2	10,2	8,0	2,4

Auswertung der Versuchsergebnisse:

Um eine Aussage über den oben beschriebenen Versuch machen zu können, müssen Leerversuche zu Beginn jeder Versuchsreihe, bei jeder neuen Charge C1-Esterase und bei vielen Testen nach etwa je 5 Tests durchgeführt werden. Ein Leerversuch hat die gleiche Versuchsanordnung wie der oben beschriebene Versuch, nur fehlt das Testserum, so daß hiermit die effektive C1-Esterase Aktivität gemessen wird. Von der für jeden Versuch erhaltenen Kurve wird zeichnerisch die Steigerung ermittelt und um vergleichbare Werte zu erhalten, auf 15 min. Versuchsdauer umgerechnet. Diese Werte geben an, wieviel ml NaOH in 15 min. verbraucht werden.

Die Berechnung der C1-Esterase-Inhibitor Aktivität basiert auf folgenden Voraussetzungen:

1. Die Ergebnisse der jeweils vorangegangenen Leerversuche werden für die entsprechenden Tests als Bezugswert angenommen und gleich 100 % gesetzt.

2. Von dem Bezugswert wird die für 15 min. verbrauchte Menge NaOH laut Testversuch subtrahiert. Man erhält die Menge NaOH, die dem Reagenz nicht zugegeben wurde, weil die C1-Esterase entsprechend gehemmt ist.
3. Der in 2. ermittelte Differenzbetrag ist ein Maß für diejenige Enzymaktivität, die auf Grund der Hemmwirkung des Inhibitors verlorengelassen. Dabei entsprechen laut Definition 0,05 ml der 0,01 n NaOH Menge gleich 1 C1-Esterase Einheit.
4. Die gehemmten C1-Esterase Einheiten können laut Definition in C1-Esterase-Inhibitor Einheiten umgerechnet werden. Dabei entsprechen 10 E C1-Esterase gleich 1 E C1-Esterase-Inhibitor.
5. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wird sich auf 1 ml Testserum bezogen.

Beispiel: 0,850 ml NaOH werden in 15 min. im Leerversuch verbraucht.

0,700 ml NaOH werden in 15 min. im Testversuch verbraucht (bei Vorlage von 10 µl Serum).

zu 2. : 0,150 ml werden nicht verbraucht, weil die Esterase gehemmt ist.

zu 3. : $0,150 \text{ ml} : 0,05 \text{ ml} = 3,00 \text{ E C1-Esterase}$

zu 4. : $3,00 \text{ E C1-Esterase} \hat{=} 0,3 \text{ E C1-Esterase-Inhibitor}$

zu 5. : In 0,01 ml Serum sind enthalten 0,3 E C1-Esterase-Inhibitor;

in 1 ml Serum sind enthalten 30 E C1-Esterase-Inhibitor.

In unserem Beispiel hat das Testserum 30 E C1-Esterase-Inhibitor pro ml Serum.

2.2.2. Mancini-Technik zur Bestimmung des C1-Esterase-Inhibitor Proteins.

Mit Hilfe der Immundiffusion nach Mancini wird eine quantitative Proteinbestimmung des C1-Esterase-Inhibitors durchgeführt. Läßt man dabei die zu bestimmende Proteinmenge gegen eine bekannte Konzentration eines spezifischen Antikörpers radial diffundieren, so bildet sich ein Präzipitationsring, dessen Fläche der Konzentration des Proteins direkt proportional ist (Mancini et al. 1965). Da hiermit allein keine Mengenangaben gemacht werden können, wird als Bezug eine Eichkurve mit einer standardisierten Proteinmenge hergestellt.

Der Agar der Partigenplatten ist mit einer bestimmten Konzentration eines Antikörpers gegen den C1-Esterase-Inhibitor beschickt. Zur Erstellung der Eichkurve wird das Behring-Standard-Humanserum OP Nr. 570, dessen C1-Esterase-Inhibitor Konzentration bekannt ist, verwendet. Von diesem Standardserum werden mit VBS-Puffer die Verdünnungen 1 : 1 (unverdünnt), 1 : 2, 1 : 3 und 1 : 4 hergestellt und jeweils 2 µl mittels Mikroliterpipetten in die ausgestanzten Löcher der Partigenplatte eingefüllt. Nach 48-stündiger Inkubationszeit bei Zimmertemperatur, wobei darauf zu achten ist, daß die Platten waagrecht zu liegen kommen (Tariertisch und Wasserwaage), hat der C1-Esterase-Inhibitor im Standardserum mit dem spezifischen Antikörper einen Präzipitationsring gebildet. Der Durchmesser der Präzipitationsringe wird mit einer Meßschablone abgelesen und anschließend quadriert. Die quadrierten Ringdurchmesser werden auf linearem Millimeterpapier als Funktion der bekannten Konzentration aufgetragen:

Abzisse : Ag-Konzentration in mg/100 ml

Ordinate : Quadrate der Ringdurchmesser in mm²

Auf diese Weise erhält man die sogenannte Eichgerade, die für jede neue Charge der Partigenplatten und des Testserums neu bestimmt werden muß.

Von den zu untersuchenden Patientenserum werden jeweils 2 µl unverdünnt und mit VBS-Puffer im Verhältnis 1 : 2 verdünnt in die noch freien Löcher der Partigenplatte einpipettiert, und die Präzipitationsringe nach 48 Stunden gemessen. Auf der Eichgeraden ist dann für jeden quadrierten Ringdurchmesser ein entsprechender Wert in mg/100 ml abzulesen.

2.3. Statistische Verfahren:

2.3.1. Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s).

Formel:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s = \sqrt{\frac{(\sum x_i)^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2}{n - 1}}$$

2.3.2. Korrelationsdiagramme.

2.3.3. Gegenüberstellung der sogenannten Normalwerte und pathologischen Werte im Histogramm.

3. ERGEBNISSE

Wie in der Einleitung schon erwähnt, gibt es verschiedene Möglichkeiten, den C1-Esterase-Inhibitor zu bestimmen:

1. Eine proteinchemische Methode (Mancini et al. 1965), bei der die Proteinmenge des C1-Esterase-Inhibitors in mg/100 ml Serum gemessen wird.
2. Eine Mikroformoltitrationsmethode (Levy u. Lepow 1959), bei der die Hemmwirkung des C1-Esterase-Inhibitors in E/ml Serum gemessen wird.

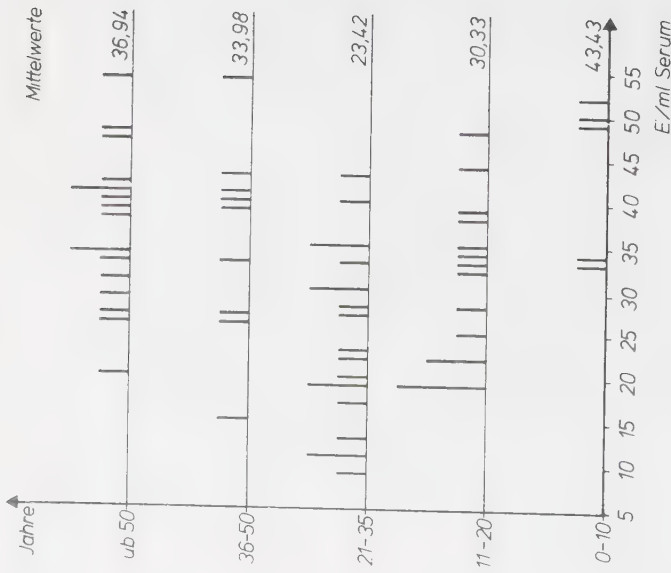
Während der erste Test nur das reine Protein ohne Rücksicht auf die Aktivitätsform erfaßt, ist der zweite ein rein funktioneller Test.

Methodenfehler:

Zur Bestimmung des Methodenfehlers bei der Mancini-Technik wird an 16 Tagen der Proteingehalt des C1-Esterase-Inhibitors in einem Standardserum gemessen. Dieses Standardserum wird uns mit einer bekannten Konzentration an C1-Esterase-Inhibitor von den Behring-Werken geliefert. Hierbei ergibt sich je nach Verdünnung ein Methodenfehler bis zu 13,5 %.

Die von Levy und Lepow (1959) angegebene Titrationsmethode wird wie in der Versuchsbeschreibung aufgeführt, angewendet. Der Methodenfehler des Versuchs wird in der Weise ermittelt, daß an 13 Tagen jeweils 3 Versuche mit einem Standardserum durchgeführt werden. Dieses Standardserum wird in Mengen von 1 ml bei -70°C aufbewahrt und täglich frisch aufgetaut, so daß die Reaktionsbedingungen immer die gleichen sind. Aus diesen 39 Versuchsergebnissen errechnet sich ein Methodenfehler von 26,5 %. Diese Werte sind

Titrationstechnik



Mancini-Technik

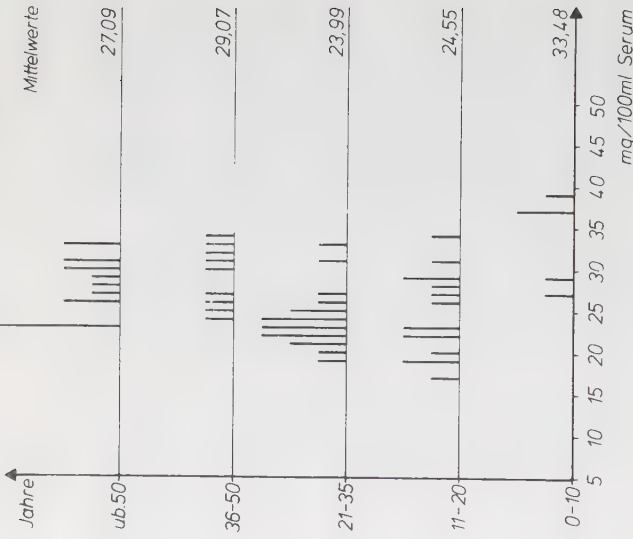


Abb.: 1 Strichdiagramm

Beziehung zwischen dem Alter der gesunden Versuchspersonen und den Meßergebnissen.

bei allen Angaben von Einheiten C1-Esterase-Inhibitor mit-
zuberücksichtigen.

Seren von klinisch Gesunden:

Um später vergleichende Aussagen bei pathologischen Seren treffen zu können, wird der C1-Esterase-Inhibitor Titer im Serum zunächst von sogenannten gesunden Versuchspersonen ermittelt. Für uns gelten als gesund solche Personen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch keine Erkrankung zeigen. Unser Kollektiv rekrutiert aus Mitarbeitern unseres Labors, Patienten aus der hiesigen orthopädischen- und Augenklinik, Klinikpersonal und Bediensteten der Bereitschafts-polizei, insgesamt 65 Personen. Als Leitfaden bei der Auswahl der Gesunden wird das Alter benutzt. Im einzelnen ergibt sich folgende Aufteilung:

Altersgruppe	männl.	weibl.
0 - 10	1	4
11 - 20	6	9
21 - 35	5	14
36 - 50	4	5
über 50	15	2

Betrachtet man die Titrationsergebnisse bei den 65 Seren von Gesunden, so errechnet sich ein Mittelwert von 32,03 E/ml mit einer Streuung von 11,28 E/ml C1-Esterase-Inhibitor. Bei der proteinchemischen Methode ergibt sich bei denselben 65 Seren ein Mittelwert von 26,36 mg/100 ml Serum mit einer Streuung von 4,89 mg/100 ml Serum.

Setzt man die Titrationswerte bzw. die proteinchemischen Werte der gesunden Personen jeweils in Beziehung zum Alter und Geschlecht, so läßt sich kein Zusammenhang herstellen (vgl. Abb.: 1).

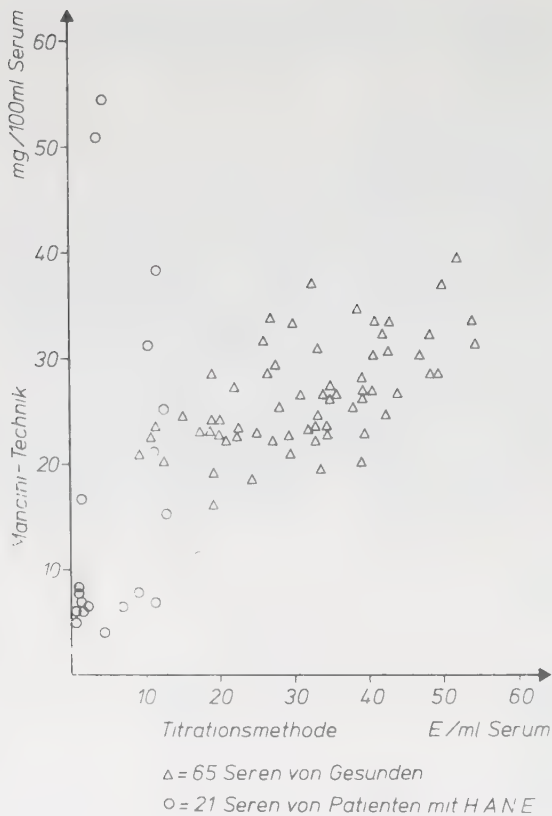


Abb. : 2

Beziehung zwischen den gemessenen Versuchsergebnissen mit der Mancini-Technik und der Titrationmethode sowohl bei Seren von gesunden Versuchspersonen als auch bei HANE-Seren.

Trägt man in einem Diagramm, bei dem auf der Abszisse die Werte für die Titrationsmethode und auf der Ordinate die Werte für die Mancini-Technik angegeben sind, die experimentell gefundenen Wertepaare der gesunden Versuchspersonen ein, so ist eine gewisse Abhängigkeit zwar in soweit zu erkennen, als einer großen Proteinmenge auch eine höhere Aktivität des C1-Esterase-Inhibitors zuzuordnen ist. Eine Regressionsgleichung, die die Umrechnung der einen Meßgröße in die andere zuläßt, kann aber nicht angegeben werden, da die individuellen Schwankungen sehr groß sind. So finden sich z.B. für Mancini-Werte zwischen 33,0 und 33,6 mg/100 ml Serum Titrationswerte von 27,0 bis 54,2 E/ml (vgl. Abb.: 2).

Pathologische Seren:

Zu den pathologischen Seren werden solche Patientenseren gezählt,

1. die uns aus dem Klinikbereich mit der Verdachtsdiagnose hereditäres angioneurotisches Ödem zugesandt wurden (35 Seren),
2. die bei den routinemäßigen Laboruntersuchungen Normabweichungen in den Komplementkomponenten C1, C2 und C4 zeigen (28 Seren).

Bei der Erläuterung der Versuchsergebnisse der unter 1. genannten Patientenseren muß unterschieden werden zwischen den Seren, die in unseren Testmethoden keine abnormen Werte aufzeigen und denen, die mehr oder weniger starke Abweichungen erbrachten. Wohl wegen der Problematik der Krankheitsbezeichnung (vgl. Diskussion) weisen von 35 Patientenseren 14 unauffällige Meßergebnisse in beiden Testmethoden auf. 21 Wertepaare dagegen lassen die Diagnose : hereditäres angioneurotisches Ödem (HANE) zu, wobei unterschieden werden kann zwischen 6 Seren, bei denen zwar eine normale oder erhöhte Eiweißmenge des C1-Esterase-Inhibitors nachweisbar, aber dieses

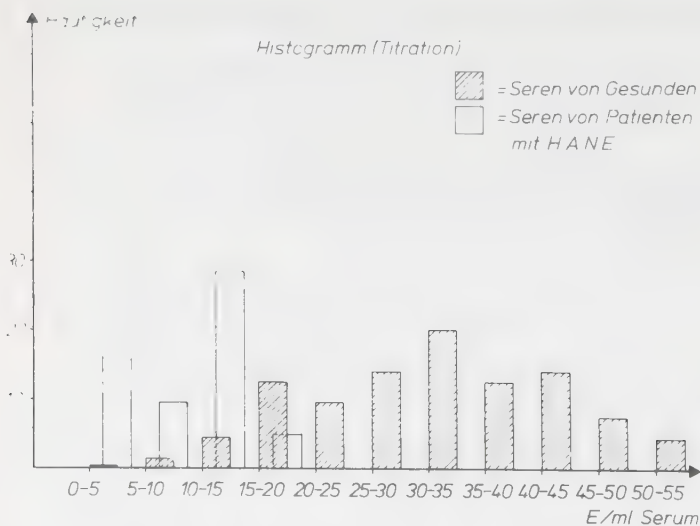
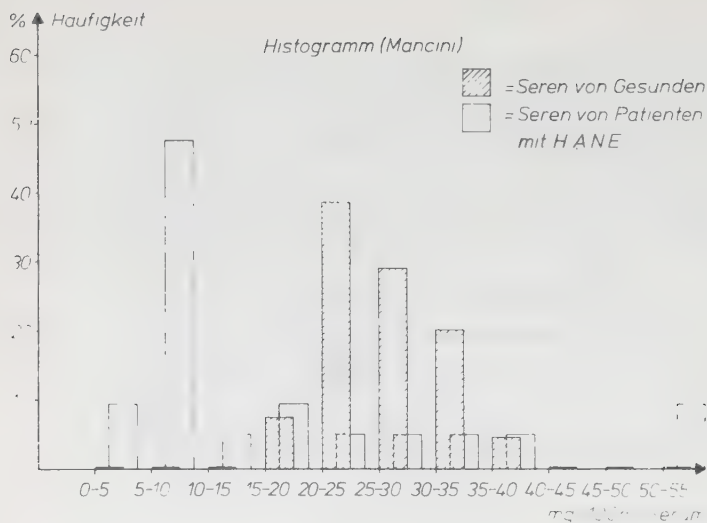


Abb.: 3 und Abb.: 4

Prozentuale Häufigkeitsverteilung aller untersuchten Seren getrennt für jede Meßmethode.

Maßeinheiten	Methode I (Mancini)				Methode II (Titration)			
	klinisch gesund		pathologisch		klinisch gesund		pathologisch	
	Häufigkeit		Häufigkeit		Häufigkeit		Häufigkeit	
	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
0 - 5	0	0	2	9,5	0	0	12	57,2
5 - 10	0	0	10	47,6	1	1,5	2	9,5
10 - 15	0	0	1	4,8	3	4,6	6	28,6
15 - 20	5	7,7	2	9,5	8	12,3	1	4,8
20 - 25	25	38,5	1	4,8	6	9,3	0	0
25 - 30	19	29,2	1	4,8	9	13,9	0	0
30 - 35	13	20	1	4,8	13	20	0	0
35 - 40	3	4,6	1	4,8	8	12,3	0	0
40 - 45	0	0	0	0	9	13,9	0	0
45 - 50	0	0	0	0	5	7,7	0	0
50 - 55	0	0	2	9,5	3	4,6	0	0
55 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb. : 5

Häufigkeitsverteilung aller untersuchten Normalseren und aller Seren von HANE-Patienten.

Protein inaktiv ist und 15 Seren, bei denen der C1-Esterase-Inhibitor Titer sowohl proteinchemisch als auch aktivitätsmäßig erniedrigt oder gar 0 ist.

Trägt man die Versuchsergebnisse dieser 21 HANE-Seren ebenfalls in das oben erwähnte Diagramm ein und vergleicht sie mit den Werten der gesunden Seren, so erkennt man keine eindeutige Trennung zwischen den pathologischen und gesunden Seren. In beiden Meßmethoden existiert vielmehr ein Bereich, in dem sowohl Werte von HANE-Patienten als auch von Gesunden liegen.

Das Histogramm, aus dem die prozentuale Häufigkeitsverteilung der Normalwerte und der HANE-Werte hervorgeht, zeigt deutlich, daß bei der Mancini-Technik über den gesamten Bereich der Normalwerte auch pathologische Werte zu finden sind (Abb.: 3 und 5). Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß 6 HANE-Seren einen normalen oder erhöhten Proteingehalt an C1-Esterase-Inhibitor aufweisen.

Eine sehr viel bessere Trennung ermöglicht die Titrationsmethode, wo nur in einem Bereich zwischen 5 E und 15 E sowohl Werte von pathologischen Seren als auch von Seren Gesunder gefunden werden (Abb.: 4 und 5). Von den 21 HANE-Seren liegen 20 unter 15 E und von den 65 Seren von Gesunden zeigen nur 4 eine kleinere Aktivität als 15 E.

Mit der Messung des C1-Esterase-Inhibitors bei Patientenserum, die unter 2. angeführt werden, soll ein möglicher Zusammenhang zwischen pathologischen Veränderungen in den Komplementkomponenten C 1, C 2 und C 4 und dem C1-Esterase-Inhibitor geprüft werden. Hierzu werden 28 Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen getestet, bei denen primär ein Defekt in den Komplementkomponenten C 1, C 2 und/oder C 4 vorliegt. Ganz im Gegensatz zu der Beobachtung, daß bei einem

C1-Esterase-Inhibitor Mangel auch die Komponenten C 4 und C 2 erniedrigt sind (vgl. Diskussion), kann ein solcher Kausalzusammenhang in umgekehrter Folge nicht festgestellt werden.

4. DISKUSSION

4.1. Zusammenstellung der Versuchsergebnisse.

Beide Meßmethoden des C1-Esterase-Inhibitors sind verhältnismäßig ungenau, was sich in einem Methodenfehler von $\pm 13\%$ für die proteinchemische und $\pm 26\%$ für die biochemische Methode zeigt.

Bei der Mancini-Technik läßt sich der Fehler in erster Linie mit Ableseschwierigkeiten erklären, da Schwankungen von 1/10 mm bereits Abweichungen von ca. 0,6 - 1 mg % ausmachen, je nachdem, ob der Ablesefehler bei einem kleinen oder großen Präzipitationsringdurchmesser entsteht.

Bei den Aktivitätsbestimmungen muß eine immer recht ungenaue Titrationsmethode berücksichtigt werden. Die Umwandlung der durch den Combitorator ermittelten Geraden in ein vergleichbares Meßergebnis ist mit einer Reihe von Fehlern behaftet, die nicht ausgeschlossen werden können. Lediglich die Versuchsungenauigkeit, die durch die sehr kleinen Reaktionsmengen bedingt ist, könnte durch andere Quantitäten vermindert werden. Auch oftmaliges Auftauen und Einfrieren sowie längeres Aufbewahren bei Zimmertemperatur können vermieden werden. Eigene Beobachtungen zeigen aber, daß bei der Titrationsmethode ein Fehler von 26 % bei weitem nicht relevant ist bei pathologischen Seren, die eine starke C1-Esterase-Inhibitor-Erniedrigung aufweisen.

Zur Beurteilung der Normalseren sind vergleichende Aussagen sehr schwierig, da alle Autoren ihre Angaben in der gleichen Einheit darstellen, aber offensichtlich Verschiedenes als eine Einheit definieren:

So geben	Donaldson, Evans (1963)	5,8	$\pm$	1,8	E/ml
	Gottstein et al. (1967)	19,38	$\pm$	2,3	E/ml
	Laurell et al. (1969)	19	-	29	E/ml und
	Harpel (1970)	41,5	$\pm$	8,79	E/ml

als Durchschnittswert für die Normalserenverteilung an.

Unsere Ergebnisse zeigen folgende Mittelwerte mit den entsprechenden Streuungen der Normalseren:

- 1) Titrationsmethode : 32,03 $\pm$ 11,28 E/ml (35 %)
- 2) Mancini-Technik : 26,36 $\pm$ 4,89 mg/100 ml (18,6 %)

Daraus ist ersichtlich, daß die Streuung bei der Mancini-Technik um fast 50 % niedriger liegt als bei der Titrationsmethode, was sicherlich auch daran liegt, daß der Methodenfehler beim Standardserum ein ähnliches Verhältnis aufzeigt. Diese Werte stimmen mit den Angaben von Gigli et al. (1968) überein, die bei der Messung des C1-Esterase-Inhibitors mit der Immunhämolysen einen Wert von 37,445 $\pm$ 17,79 E/ml erhält.

Bei den 35 Seren, die zur Laboruntersuchung mit dem Verdacht auf ein HANE vorliegen, zeigen 14 Patientenseren Normalwerte im C1-Esterase-Inhibitor Test. Hier müssen sicherlich die noch bestehenden Unklarheiten über eine genaue Begriffsbestimmung berücksichtigt werden. So unterscheidet Landermann (1962) vier Gruppen des Ödems:

1. genetisch bedingte Erkrankungen
 - a) das hereditäre, nicht allergische Ödem,
 - b) das hereditäre, allergische Ödem
2. nicht genetisch bedingte Erkrankungen
 - a) ein Ödem, das durch Allergene ausgelöst wird,
 - b) ein Ödem, dessen Ätiopathologie unklar ist.

Eine andere Einteilung von Wüthrich (1970) scheint recht sinnvoll zu sein. Er stellt das hereditäre angioneurotische Ödem (HANE) mit Komplementbeteiligung als Sonderform dem Quincke Ödem gegenüber. Aus klinischer Sicht sind diese Unterscheidungen nur schwer zu treffen, so daß eine genaue Diagnose nur in Verbindung mit einer Laboruntersuchung gestellt werden kann.

4.2. Vergleich der beiden Testmethoden.

Für den Nachweis der Komplementbeteiligung bzw. der pathologischen Veränderung des C1-Esterase-Inhibitors ist, wie die Ergebnisse zeigen, die Titrationsmethode die aussagekräftigere, denn sie trennt trotz ihrer Ungenauigkeit sehr viel besser zwischen gesundem und krankem Patientenkollektiv. Der in den Ergebnissen angeführte Unsicherheitsbereich zwischen 5 und 15 E ist praktisch so zu interpretieren, daß Meßergebnisse unter 15 E mit recht großer Wahrscheinlichkeit als pathologisch anzusehen sind.

Die Mancini-Technik gewinnt erst dann an Bedeutung, wenn bei der Titrationsmethode ein pathologischer Wert des Inhibitors gefunden wird. Sie gibt Aufschluß darüber, ob es sich um einen Inhibitor Mangel oder um ein inaktives Inhibitor Protein handelt.

Diese beiden Möglichkeiten als einzige Einteilung des C1-Esterase-Inhibitor Defektes zweifelt Kueppers et al. (1972) an. Er konnte kürzlich von mehreren Familienmitgliedern aus drei Generationen mit HANE eine stark erhöhte Serumkonzentration an inaktivem C1-Esterase-Inhibitor beschreiben und erklärt dies als eine neue genetische Variante. Eine andere Theorie besagt, daß der Inhibitor bei Patienten mit HANE in einer mit der Methode nicht meßbaren, sehr niedrigen Aktivität vorliegt, nicht aber völlig fehlt. Diese Behauptung stützt sich auf die Beobachtung, daß nach einer Therapie mit Prednisolon die C1-Esterase-Inhibitor Aktivität deutlich ansteigt (Gottstein et al. 1967). Hieraus

wird ersichtlich, daß noch lange nicht ausreichende Klarheit über die Mitbeteiligung des C1-Esterase-Inhibitors an dem HANE besteht.

4.3. Pathophysiologische Mechanismen im Komplementsystem im Zusammenhang mit dem hereditären angioneurotischen Ödem.

Da es in dieser Arbeit weniger auf die klinischen Aspekte des hereditären angioneurotischen Ödems ankommen soll, sind weder der Krankheitsverlauf noch der Erbgang bei der Auswahl der Patientenseren berücksichtigt worden. Hier sollen nur die pathophysiologischen Mechanismen, die mit dem HANE in Zusammenhang stehen, näher untersucht werden. Bei den 21 Seren, die einen Defekt am C1-Esterase-Inhibitor haben, werden die Komplementkomponenten C 1, C 2 und C 4 gemessen, wobei sich folgende Werte ergeben:

Tabelle:

	erniedrigter C2-Titer	normaler C2-Titer	erniedrigter C4-Titer	normaler C4-Titer
15 Seren mit C1-Esterase-Inhibitor Mangel	12	3	15	-
6 Seren mit inaktivem C1-Esterase-Inhibitor	3	3	4	2

Unsere Meßergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Carpenter et al. (1969) überein, wonach die C4-Titer meistens erniedrigt sind.

Die C2-Titer schwanken mit dem Krankheitsverlauf und können in anfallsfreien Perioden oft normale Werte zeigen (Donaldson, Rosen 1964; Austen, Sheffer 1965; Laurell et al. 1966; Pickering et al. 1968; Ruddy, Austen 1967). Unbeeinflusst von diesen Titterschwankungen bleibt die C3-Konzentration (Alper, Rosen 1967).

Zu der C4 und C2 Erniedrigung kommt es, wenn auf Grund einer C1-Esterase-Inhibitor Inaktivität die C1-Esterase eine erhöhte Aktivität zeigt und damit die Komplementkomponenten C 4 und C 2 vermehrt verbraucht werden (Austen, Sheffer 1965; Ruddy et al. 1968).

Die C1-Esterase Aktivität schwankt mit dem Krankheitsverlauf und ist während eines Anfalls am größten (Donaldson, Rosen 1964; Siboo, Laurell 1965). Sie wird für die lokalen und plötzlich auftretenden Hautödeme verantwortlich gemacht, denn Untersuchungen von Klemperer et al. (1968) konnten zeigen, daß durch subcutane Injektion von gereinigtem C1s (Haines, Lepow 1964) ein Ödem provoziert werden kann, das histologisch dieselben Gewebeveränderungen hervorruft, wie sie bei einem HANE beobachtet werden.

Unbekannt sind die Mechanismen, die die C1-Esterase Aktivierung bewirken. Lediglich Untersuchungen in vitro weisen nach, daß die Aktivierung durch Plasmin (Ratnoff, Naff 1967) und Kallikrein (Gigli et al. 1968) erfolgen kann. Donaldson (1968) beschreibt, daß bei HANE-Plasma eine schnelle C1 Aktivierung durch Urokinase und durch den aktivierten Hageman-Faktor erreicht wird, wobei wahrscheinlich das Kininsystem und fibrinolytische Mechanismen mitbeteiligt sind. Der C1-Esterase-Inhibitor hemmt nämlich auch Plasmin und Kallikrein und den Globulin-permeabilitätsfaktor (Kagan, Becker 1963; Ratnoff et al. 1969).

Plasma von HANE-Patienten, welches im Anfall abgenommen wurde, erzeugt bei an HANE erkrankten Patienten bei intracutaner Injektion ein Ödem (Landerman et al. 1962). Hierfür macht Donaldson et al. (1969)

einen Gefäßpermeabilitätsfaktor verantwortlich, den er als dialysierbares, hitzestabiles Polypeptid darstellt. Dieser Faktor unterscheidet sich sowohl in seiner chemischen Zusammensetzung als auch in seinen biologischen Eigenschaften von Bradykinin, das ursprünglich für die Gefäßpermeabilität verantwortlich gemacht wurde (Landerman et al. 1962; Becker, Kagan 1964).

Wahrscheinlich wird bei der Reaktion von $C\bar{I}$ mit C_4 und C_2 im HANE-Plasma ein kininähnliches Polypeptid freigesetzt, das sich offensichtlich von der Komplementkomponente C_2 ableitet (Klemperer et al. 1968; Donaldson et al. 1970).

4.4. Therapiemöglichkeiten.

Aus der Problematik heraus, daß die pathologischen Mechanismen des HANE bis heute nicht bekannt sind, hat es an empirischen Versuchen zur Therapie nicht gefehlt. Obwohl Antihistaminica beim Meerschweinchen eine Ödembildung verhindern können (Ratnoff, Lepow 1963), bleiben orale Applikationen von Antihistaminica beim Menschen wirkungslos (Klemperer et al. 1968).

Hauptsächlich Mißerfolge haben Dennehy (1970) zu der Veröffentlichung bewogen, daß ausgewählte Diät, Sympathicomimetica, adrenocorticotropes Hormon, Corticosteroide, Sedativa und Vitamine sowohl während eines Anfalls als auch als vorbeugende Maßnahme nur sehr zweifelhaften Erfolg haben. Juhlin, Michaelsson (1969) empfehlen die Therapie mit einem Kallikreininhibitor, z.B. mit Trasylol.

Wie oben schon erwähnt, bewirkt Prednisolon einen Anstieg der $C\bar{I}$ -Esterase-Inhibitor Aktivität und damit "eine Besserung der klinischen Symptomatik während eines Quincke-Ödem-Anfalles" (Cottstein et al. 1967). Eine Therapiemöglichkeit mit ϵ -Aminocapronsäure wird von Frank et al. (1972) beschrieben. Dieses als Epsamon^R bekannte Präparat

ist eine lysinähnliche Verbindung, die die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin hemmt und damit die Aktivierung der C1-Esterase (Lundh et al. 1968). Donaldson (1972) weist auf das Risiko und die Nebenwirkungen bei längerer Einnahme hin. Thrombosen und ausgedehnte Muskelnekrosen sollen dabei aufgetreten sein. Als Ersatzpräparat wird in der Literatur deshalb die Trans-4-(aminomethyl)-cyclohexancarboxylsäure (AMCA^R) empfohlen. Sie soll eine anfallverhütende Wirkung bei guter Verträglichkeit haben.

Einige Erfolge hat die Infusion von in frischem Zustand gefrorenem Plasma gezeigt (Pickering et al. 1969). In solchem frischen oder frisch gefrorenem Plasma ist der hitzelabile C1-Esterase-Inhibitor angeblich noch aktiv enthalten. Hiermit war der Anfang für eine echte Kausaltherapie gemacht. Durch allgemeine Fortschritte sowohl in der Proteinchemie als auch in der immunsuppressiven Therapie wurde es Pondman (1973) möglich, gute Erfolge mit der Injektion von gereinigtem C1-Esterase-Inhibitor zu erzielen. Hierdurch stellt sich die Forderung, daß bei Verdacht auf ein hereditäres angioneurotisches Ödem differentialdiagnostisch durch eine Laboruntersuchung geklärt werden muß, ob der C1-Esterase-Inhibitor pathologisch verändert ist, um gegebenenfalls die oben erwähnte Therapie einleiten zu können. Hierbei ist es gleichgültig, ob der C1-Esterase-Inhibitor inaktiv ist oder ob er völlig fehlt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden zwei direkte Meßmethoden zur quantitativen Bestimmung des C1-Esterase-Inhibitors beschrieben und auf ihre Anwendung als routinemäßige Laboruntersuchung zur Diagnose eines HANE miteinander verglichen. Bei der Bestimmung des C1-Esterase-Inhibitors in 65 Seren von gesunden Personen ergibt sich für die Titrationsmethode ein Mittelwert von 32,03 E/ml mit einer Streuung von 11,28 E/ml und für die proteinchemische Bestimmung mit der Mancini-Technik ein Mittelwert von 26,38 mg/100 ml mit einer Streuung von 4,89 mg/100 ml. Da bei dem Krankheitsbild des HANE der C1-Esterase-Inhibitor sowohl vermindert als auch inaktiv vorliegen kann, können mit der Mancini-Technik nicht alle HANE-Patienten erfaßt werden. Aus den Messungen von 21 HANE-Seren mit der Titrationsmethode wird ein Bereich zwischen 5 - 15 E/ml angegeben, bei dem möglicherweise eine pathologische Veränderung des C1-Esterase-Inhibitors vorliegt. Unter 5 E/ml ist der C1-Esterase-Inhibitor mit Sicherheit pathologisch. Zur Sicherung der Diagnose ist deshalb bei Verdacht auf ein HANE die Bestimmung der C1-Esterase-Inhibitor Aktivität mit der Titrationsmethode unerläßlich, denn nur beim hereditären angioneurotischen Ödem mit einem C1-Esterase-Inhibitor Defekt ist eine Therapie mit der Substitution von gereinigtem C1-Esterase-Inhibitor sinnvoll.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALPER, C.A., F.S. ROSEN
Studies of the in Vivo Behavior of Human C 3 in Normal
Subjects and Patients.
J. Clin. Invest. 46, 2021 (1967)
2. AUSTEN, K.F., A.L. SHEFFER
Detection of Hereditary Angioneurotic Edema by
Demonstration of a Reduction in the Second Component
of Human Complement.
N.Engl.J.Med. 272, 649 (1965)
3. BECKER, E.L., L.J. KAGEN
The Permeability Globulins of Human Serum and the Bio-
chemical Mechanism of Hereditary Angioneurotic Edema.
Ann.N.Y. Acad.Sci. 116, 866 (1964)
4. CARPENTER C.B., et. al.
Complement Metabolism in Man : Hypercatabolism of the
Fourth (C4) and Third (C3) Components in Patients with
Renal Allograft Rejection and Hereditary Angioedema (HAE).
J. Clin. Invest. 48, 1495 (1969)
5. DENNEHY, J.J.
Report of a Large Kindred with Defect in C1-Esterase-
Inhibitor and Review of the Literature.
Ann.Intern.Med. 73, 55 (1970)
6. DONALDSON, V.H., R.R. EVANS
A Biochemical Abnormality in Hereditary Angioneurotic
Edema. Absence of Serum Inhibitor of C1-Esterase.
Amer.J.Med. 35, 37 (1963)

7. DONALDSON, V.H., F.S. ROSEN
Action of Complement in Hereditary Angioneurotic Edema:
The Role of the C1-Esterase.
J. Clin. Invest. 43, 2204 (1964)
8. DONALDSON, V.H., F.S. ROSEN
Hereditary Angioneurotic Edema : A Clinical Survey.
Pediatrics 37, 1017 (1966)
9. DONALDSON, V.H.
Mechanism of Activation of C1-Esterase in Hereditary
Angioneurotic Edema Plasma in Vitro.
J. Exp.Med. 127, 411 (1968)
10. DONALDSON, V.H., et al.
Permeability-Increasing Activity in Hereditary
Angioneurotic Edema Plasma. II. Mechanism of Formation
and Partial Characterization.
J.Clin.Invest. 48, 642 (1969)
11. DONALDSON, V.H., et al.
A Polypeptide Kinin in Hereditary Angioneurotic Plasma :
Role of Complement in its Formation.
J. Lab.Clin.Med. 76, 986 (1970)
12. DONALDSON, V.H.
Therapy of "the Neurotic Edema".
N.Engl. J.Med. 286, 835 (1972)
13. FRANK, M.M., et al.
Epsilon Aminocaproic Acid Therapy of Hereditary Angio-
neurotic Edema. A Double-Blind Study.
N.Engl. J.Med. 286, 808 (1972)

14. GIGLI, I., S. RUDDY, K.F. AUSTEN
The Stoichiometric Measurement of the Serum Inhibitor
of the First Component by the Inhibition of Immune
Hemolysis.
J. Immunol. 100, 1154 (1968)
15. GOTTSTEIN, U., D.J. YOO, H. BUETTNER
C1-Esterase und C1-Esterase-Inhibitor im Serum von
Kranken mit Hereditärem genuinem Quincke-Ödem.
Klin. Wschr. 45, 230 (1967)
16. HAINES, A.L., I.H. LEPOW
Studies on Human C1-Esterase. I. Purification and
Enzymatic Properties.
J. Immunol. 92, 456 (1964)
17. HARPEL, C.P.
A Sensitivity, Colorimetric Method for the Measurement
of Serum C1-Inactivator Using the Substrate N- α -Acetyl-
L-Lysine Methyl Ester.
J. Immunol. 104, 1024 (1970)
18. JOHNSON, A.M., et al.
C1 Inhibitor: Evidence for Decreased Hepatic Synthesis
in Hereditary Angioneurotic Edema.
Science 173, 553 (1971)
19. JUHLIN, L., G. MICHAELSSON
Use of a Kallikrein Inhibitor in the Treatment of Urticaria
and Hereditary Angioneurotic Edema.
Acta dermat.-venereol. (Stockh.) 49, 37 (1969)

20. KAGEN, L. J., E. L. BECKER
Inhibition of Permeability Globulins by C1-Esterase-Inhibitor.
Fed. Proc. 22, 613 (1963)
21. KLEMPERER, M.R., V.H. DONALDSON, F.S. ROSEN
Effect of C1-Esterase on Vascular Permeability in Man:
Studies in Normal and Complement-Deficient Individuals
an in Patients with Hereditary Angioneurotic Edema.
J. Clin. Invest. 47, 604 (1968)
22. KUEPPERS, F., U. BERENDES, E. SCHOEPE
Inherited High Serum Levels of a Functionally Deficient
Complement Esterase Inhibitor Associated with Hereditary
Angioedema.
Hum. Genet. 15, 119 (1972)
23. LANDERMANN, N.S.
Hereditary Angioneurotic Edema. I. Case Reports and
Review of the Literature.
J. Allergy 33, 316 (1962)
24. LANDERMANN, N.S., et al.
Hereditary Angioneurotic Edema. II. Deficiency of
Inhibitor for Serum-Globulin-Permeability Factor and / or
Plasma Kallikrein.
J. Allergy 33, 330 (1962)
25. LAURELL, A.B., et al.
Complement Components in Three Pathological Sera:
Relation to Clinical States.
Clin. Exp. Immunol. 1, 13 (1966)

26. LAURELL, A.B., et al.
Enzymatic and Immunochemical Estimation of C1-Esterase-Inhibitor in Sera from Patients with Hereditary Angioneurotic Edema.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 24, 221 (1969)

27. LAURELL, A.B., U. MARTENSSON
C1 Inactivator Protein Complexed with Albumin in Plasma from a Patient with Angioneurotic Edema.
Eur. J. Immunol. 1, 146 (1971)

28. LEPOW, I.H., O.D. RATNOFF, L.R. LEVY
Studies on the Activation of a Proesterase Associated with Partially Purified First Component of Human Complement.
J. Exp. Med. 107, 451 (1958)

29. LEPOW, I.H., et al.
Chromatography Resolution of the First Component of Human Complement into Three Activities.
J. Exp. Med. 117, 983 (1963)

30. LEVY, L.R., I.H. LEPOW
Assay and Properties of Serum Inhibition of C1-Esterase.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 608 (1959)

31. LOOS, M., H.U. WOLF, W. OPFERKUCH
The C1 Inactivator from Guinea Pig Serum-III
Immunochemistry 9, 451 (1972)

32. LUNDH, B., et al.
A Case of Hereditary Angioneurotic Edema, Successfully Treated with Epsilon-Aminocaproic Acid. Studies on C1-Esterase-Inhibitor, C1-Activation, Plasminogen Level, an Histamin Metabolism.
Clin. Exp. Immunol. 3, 733 (1968)

33. MANCINI, G., A.O. CARBONARA, J.F. HEREMANS
Immunochemical Quantitation of Antigens by Single
Radial Immunodiffusion.
Immunochemistry 2, 235 (1965)
34. MAYER, M.M.
Complement and Complement Fixation.
In: Experimental Immunochemistry
Hrsg.: Kabat E.A., M.M. Mayer
Springfield (Illinois) (1961) S. 133
35. NAFF, G.B., J. PENSKY, I.H. LEPOW
The Macromolecular Nature of the First Component
of Human Complement.
J. Exp. Med. 119, 593 (1964)
36. NAFF, G.B., O.D. RATNOFF
The Enzymatic Nature of C1r: Conversion of C1s to
C1-Esterase and Digestion of Amino Acid Esters by C1r.
J. Exp. Med. 128, 571 (1968)
37. OSLER, W.
Hereditary Angioneurotic Edema.
Amer. J. Med. Sci. 95, 362 (1888)
38. PENSKY, J., L.R. LEVY, I.H. LEPOW
Partial Purification of a Serum Inhibitor of C1-Esterase.
J. Biol. Chem. 236, 1674 (1961)

39. PENSKEY, J., H.G. SCHWICK
Human Serum Inhibitor of C1-Esterase: Identity with
 α -2-Neuraminoglycoprotein.
Science 163, 698 (1969)
40. PICKERING, R.J., et al.
The Complement System in Hereditary Angioneurotic
Edema. A New Perspective.
Clin. Exp. Immunol. 3, 423 (1968)
41. PICKERING, R.J., et al.
Replacement Therapy in Hereditary Angioedema.
Successful Treatment of Two Patients with Fresh-Frozen
Plasma.
Lancet 1, 326 (1969)
42. PONDMAN, K.W.
persönliche Mitteilung (1973)
43. QUINCKE, H.
Über akutes umschriebenes Hautödem.
Mh. prakt. Derm. 1, 129 (1882)
44. RATNOFF, O.D., J.H. LEPOW
Complement as a Mediator of Inflammation.
Enhancement of Vascular Permeability by Purified
Human C1 Esterase.
J. Exp. Med. 118, 681 (1963)

45. RATNOFF, O.D., G.B. NAFF
The Conversion of C1s to C1-Esterase by Plasmin
and Trypsin.
J. Exp. Med. 125, 337 (1967)
46. RATNOFF, O.D., et al.
The Inhibition of Plasmin, Plasma Kallikrein, Plasma
Permeability Factor, and the C1r Subcomponent of the
First Component of Complement by Serum C1-Esterase-
Inhibitor.
J. Exp. Med. 129, 315 (1969)
47. ROSEN, F.S., et al.
Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants.
Science 148, 957 (1965)
48. ROSEN, R.S., et al.
Genetically Determined Heterogeneity of the C1-
Esterase-Inhibitor in Patients with Hereditary
Angioneurotic Edema.
J. Clin. Invest. 50, 2143 (1971)
49. RUDDY, S., K.F. AUSTEN
A Stoichiometric Assay for the Fourth Component of
Complement in Whole Human Serum Using EAC1a^{gp} and
Functionally Pure Human Second Complement.
J. Immunol. 99, 1162 (1967)

50. RUDDY, S., et al.
Complement Component Levels in Hereditary Angioneurotic Edema and Isolated C2 Deficiency in Man.
In: Immunopathology (Vth International Symposium 1967)
Hrsg.: Miescher, P.A., P. Grabar
Basel (1968) S. 231
51. RUDDY, S., K.F. AUSTEN
Natural Control Mechanisms of the Complement System.
In: Biological Activities of Complement.
Hrsg.: Ingram, D.G.
Basel (1972) S. 13
52. SCHULTZE, H. E., K.U. HEIDE, H. HAUPT
Über ein bisher unbekanntes saures α -2-Glycoprotein.
Naturwissenschaften 49, 133 (1962)
53. SIBOO, R., A.B. LAURELL
Studies on Purified C1-Esterase and Hereditary Angioneurotic Edema Sera by Combined Electrophoresis and Immune Haemolysis.
Acta Path. Microbiol. Scand. 65, 413 (1965)
54. WUETHRICH, B.
Das hereditäre Angio-Ödem: eine Sonderform des Quincke-Ödems mit angeborenem, familiärem Defekt im Komplementsystem.
Hautarzt 21, 418 (1970)

LEBENS LAUF

Am 19.2.1947 wurde ich als Sohn des Rechtsanwaltes Dr. Hans Bohn und seiner Ehefrau Ilse, geborene Lückerrath in Köln geboren.

Von Ostern 1953 bis Ostern 1958 besuchte ich die evangelische Volksschule Wuppertal-Hahnerberg. Dann wurde ich Schüler des neusprachlichen Gymnasiums in Wuppertal-Cronenberg. Durch den Umzug meiner Eltern nach Köln kam ich in die naturwissenschaftliche Untertertia der Otto Kühne-Schule in Bad Godesberg und wurde dort Internatsschüler. Am 4.11. 1966 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Ab 3.4.1967 leistete ich für zwei Jahre den Militärdienst in der Sanitätsgruppe ab.

Im Sommersemester 1969 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Zahnheilkunde und legte dort am 2.4.1970 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 5.10.1971 die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Zur Zeit bin ich im fünften klinischen Semester und beabsichtige, mich nach dem Wintersemester 1973/74 zum zahnmedizinischen Staatsexamen zu melden.

